

# *Ministero delle Attività Produttive*

*Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività*

*Ufficio Italiano Brevetti e Marchi*

*Ufficio G2*



**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:  
Invenzione Industriale N. TO2003A000789 del 07/10/2003**

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

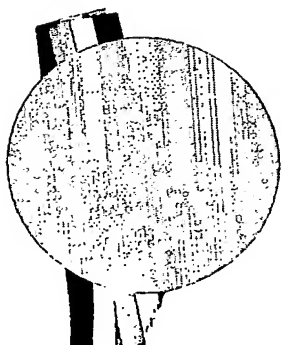
Roma, li..... **25 AGO. 2004**

IL FUNZIONARIO

*Giampietro Carlotta*

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N° **10 2003 A 0 007 8**



CAMERA DI COMMERCIO  
INDUSTRIA ARTIGIANATO  
e AGRICOLTURA  
DI TORINO

**A. RICHIEDENTE/I**

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	PROFESSIONAL DIETETICS S.R.L.		
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	PG	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3 P. IVA 11817800151
INDIRIZZO COMPLETO	A4	VIA F. PETRARCA, 22 - 20123 MILANO		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2		COD. FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
<b>A. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO</b>	B0	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1			
INDIRIZZO	B2			
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	B3			
<b>C. TITOLO</b>	C1	"COMPOSIZIONI A BASE DI AMINOACIDI PER IL TRATTAMENTO DI CONDIZIONI PATOLOGICHE CONTRADDISTINTE DA INSUFFICIENTE FUNZIONE MITOCONDRIALE"		

**D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)**

COGNOME E NOME	D1	DIOGUARDI FRANCESCO SAVERIO
NAZIONALITÀ	D2	ITALIANA
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	

	SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
<b>E. CLASSE PROPOSTA</b>	E1	E2	E3	E4	E5

<b>F. PRIORITÀ</b>					
DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO					
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DI DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DI DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
<b>G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI</b>	G1				
FIRMA DEL/DEI	Ing. Franco BUZZI				
RICHIEDENTE/I	N. Iscriz. ALBO 259 (in proprio e per gli altri)				

**I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM**

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI (DPR 20.10.1998 N. 403).

NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME;	I1	N. ISCR. ALBO 259 BUZZI FRANCO; N. ISCR. ALBO 258 NOTARO GIANCARLO; N. ISCR. ALBO 260 BOSOTTI LUCIANO; N. ISCR. ALBO 507 MARCHITELLI MAURO; N. ISCR. ALBO 335 SERTOLI GIOVANNI
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	BUZZI, NOTARO & ANTONIELLI D'OULX S.R.L.
INDIRIZZO	I3	VIA MARIA VITTORIA, 18
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	I4	10123 TORINO - TO
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	SI DEPOSITA AUTOCERTIFICAZIONE IN SOSTITUZIONE DELLA LETTERA DI INCARICO

**M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE**

TIPO DOCUMENTO	N. ES. AL.	N. ES. RIS.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ. (OBBLIGATORI 2 ESEMPLARI)	2		24
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE, 2 ESEMPLARI)			
DESIGNAZIONE D'INVENTORE			
DOCUMENTI DI PRIORITÀ CON TRADUZIONE IN ITALIANO			
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE			
	(SI/NO)		
LETTERA D'INCARICO	NO		
PROCURA GENERALE	NO		
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE	NO		
	(LIRE/EURO)		
ATTESTATI DI VERSAMENTO	€	IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE DUECENTONOVANTUNO/80 (291,80)	
FOGLIO AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI PARAGRAFI (BARRARE I PRESCELTI) DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA? (SI/NO)	A	D	F
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO? (SI/NO)	SI		
	NO		
DATA DI COMPILAZIONE	6 OTTOBRE 2003		
FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I	Ing. Franco BUZZI N. Iscriz. ALBO-259 (in proprio e per gli altri)		

**VERBALE DI DEPOSITO**

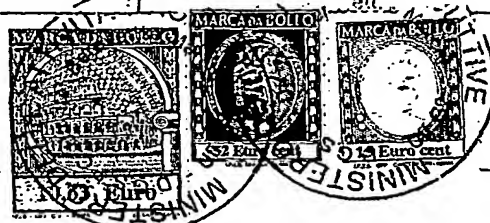
NUMERO DI DOMANDA	102003A000789		COD. 01
C.C.I.A.A. DI TORINO			
IN DATA 7 OTTOBRE 2003	IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME		
LA PRESENTE DOMANDA CORREDATA DI N.	FOGLI AGGIUNTIVI PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRARIPORTATO.		
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE			
IL DEPOSITANTE	CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA DELL'UFFICIO		L'UFFICIALE ROGANTE Enrico MIGLIO CATEGORIA C

**PROSPETTO MODULO A**  
**DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE**

NUMERO DI DOMANDA: **10 2003 A 0007 89** DATA DI DEPOSITO: **7 OTTOBRE 2003 PR**

**A. RICHIEDENTE/I** COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO

PROFESSIONAL DIETETICS S.R.L.  
MILANO



**C. TITOLO**

COMPOSIZIONI A BASE DI AMINOACIDI PER IL TRATTAMENTO DI CONDIZIONI PATOLOGICHE  
CONTRADDISTINTE DA INSUFFICIENTE FUNZIONE MITOCONDRIALE

SEZIONE

CLASSE

SOTTOCLASSE

GRUPPO

SOTTOGRUPPO

**E. CLASSE PROPOSTA**

**O. RIASSUNTO**

VENGONO DESCRITTE COMPOSIZIONI IDONEE AL TRATTAMENTO DI CONDIZIONI PATOLOGICHE CONTRADDISTINTE DA INSUFFICIENTE O RIDOTTA FUNZIONE MITOCONDRIALE. LE COMPOSIZIONI COMPRENDONO, QUALI PRINCIPALI INGREDIENTI ATTIVI, GLI AMINOACIDI LEUCINA, ISOLEUCINA E VALINA. SONO PREFERIBILMENTE PREVISTI, QUALI ULTERIORI INGREDIENTI ATTIVI, GLI AMINOACIDI TREONINA E LISINA, ED EVENTUALMENTE ISTIDINA, FENILALANINA, METIONINA, TRIPTOFANO, NONCHÉ TIROSINA E CIST(E)INA.

**P. DISEGNO PRINCIPALE**

FIRMA DEL/DEI

RICHIEDENTE/I

**Ing. Franco BUZZI**

N. Iscriz. ALBO 259

(in proprio e per gli altri)

CAMERA DI COMMERCIO  
INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA  
DI TORINO

**DESCRIZIONE** dell'invenzione industriale dal titolo:

"Composizioni a base di aminoacidi per il trattamento di condizioni patologiche contraddistinte da insufficiente funzione mitocondriale"

di: Professional Dietetics S.r.l., nazionalità italiana, Via F. Petrarca, 22 - 20123 Milano

Inventore designato: Francesco Saverio DIQUARDI

Depositata il: 7 ottobre 2003

TO 2 0 0 3 A 0 0 0 7 8 9

\* \* \*

**TESTO DELLA DESCRIZIONE**

La presente invenzione si riferisce a composizioni per il trattamento di condizioni patologiche contraddistinte da insufficiente funzione mitocondriale

Patologie specifiche dei mitocondri sono state identificate da circa 40 anni, quando uno specifico DNA mitocondriale è stato identificato. Tuttavia solo durante gli anni novanta dello scorso secolo la migliore conoscenza della sintesi, struttura e funzione dei mitocondri è stata collegata a riscontri clinici specifici, ed anche a malattie degenerative correlate all'età. Grazie a tali conoscenze si è identificata una serie di patologie mitocondriali primitive e secondarie, così come i diversi organi bersaglio delle lesioni mitocondriali, quali il sistema nervoso centrale (e quindi il Parkinson, la sclerosi laterale amiotrofica, l'Alzheimer), il sistema cardiovascolare in relazione all'invecchiamento, i muscoli scheletrici, la micro-macroangiopatia, eccetera.

Gli approcci terapeutici derivati da tali conoscenze sono ancora primitivi e focalizzati soprattutto sulla prevenzione del danno ossidativo (Lufth R. and London B. R. - J. Intern. Med., 1995: 238, 405 -421). Effettivamente, la produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS = Reactive Oxygen Species),

BUZZI, NOTARO &  
ANTONELLI D'OULX  
s.r.l.

che sono i prodotti di scarto del metabolismo ossidativo, è stata correlata alla accumulazione progressiva del danno del DNA e delle proteine a diversi livelli negli organi e nelle cellule, secondo la cosiddetta ipotesi di Harman (Harman C. V. - Am. Geriatr. Soc., 1972: 20, 145-147), e correlato all'invecchiamento. Sino ad ora gli approcci terapeutici sono stati centrati su sostanze anti-ossidanti, quali N-acetyl-Cysteina (Martines Bañaclocha M., Brain Res., 2000: 859, 173-175), glutatione (Viria et al., 1992 in Free Radicals and Aging, 136-144, Birkhanserlag, Basel), la vitamina C (Ghosh M. K. et al., Free Radical Res., 1996: 25, 173-179), la carnitina (Hagen T. Metal, 1998, Proc. Math. Acad. Sci. USA, 95: 9562-9666); alcuni risultati sperimentali sembrano confermare che la vita media e massima delle linee cellulari sia favorevolmente prolungata quando le quantità di anti-ossidanti sono sufficienti ad eliminare lo stress ossidativo mitocondriale, restaurando l'attività metabolica dei mitocondri.

La presente invenzione indica la possibilità di un approccio terapeutico assolutamente innovativo al problema suddetto, basato sull'impiego di specifiche quantità di determinati aminoacidi.

Tre quarti dei fabbisogni totali di azoto sono coperti da soli cinque aminoacidi: leucina, isoleucina, valina, treonina e lisina. Ciò significa che tutti gli altri aminoacidi, essenziali e non, contenuti nelle proteine dietarie servono a coprire solo il restante 25% del fabbisogno di azoto dell'organismo dei mammiferi. Non esistono in natura proteine con un contenuto di aminoacidi stechiometricamente simile a quanto necessario a coprire il fabbisogno di azoto negli umani. Questo spiega perché una eccessiva introduzione proteica alimentare è possibile fonte di tanti problemi medici: l'introduzione di un eccesso di aminoacidi rispetto a quelli necessari ed utilizzabili si tradurrà in un

**BUZZI, NOTARO &  
ANTONELLI D'OUX  
s.r.l.**

sovraccarico funzionale dei meccanismi di eliminazione delle scorie, e non in un miglioramento delle funzioni dipendenti dalla disponibilità di aminoacidi.

In tale ottica gli aminoacidi possono essere paragonati a delle lettere, e le proteine, quindi, alle parole. Le sintesi si attivano e procedono solamente nelle condizioni in cui sia presente una quantità adeguata alla costituzione dell'intera proteina finale di tutti gli aminoacidi necessari; in caso contrario, la sintesi non inizierà nemmeno. Quindi, non solo gli aminoacidi saranno necessari nelle qualità corrette, ma anche nelle quantità adeguate di ciascuno: come le lettere per scrivere una determinata parola; si prenda ad esempio la parola italiana "proteine": per scriverla sono necessarie una p, una r, una o, una t, una i, una n, ma due lettere e. Il rapporto corretto fra aminoacidi non è esprimibile in grammi, ma in numero di molecole, nel rapporto reciproco fra di loro, e funzione della concentrazione di aminoacidi presenti nella proteina da sintetizzare. Quindi, i rapporti sono più correttamente espressi come numero di molecole, cioè in grammo-moli. Questo è il modo più preciso di esprimere il rapporto, propriamente detto rapporto stechiometrico, fra aminoacidi necessari alla sintesi delle proteine.

Un ulteriore livello di complessità è dovuto al fatto che la sintesi delle proteine è processo assai dispendioso dal punto di vista energetico; pertanto le sintesi non procedono se non vi sia nella cellula una disponibilità adeguata di energia, e l'energia è prodotta dai mitocondri. La produzione di energia comunemente si fa dipendere dalla glicolisi anaerobica del glucosio e dalla  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi liberi (FFA = Free Fatty Acids), che forniscono i due principali substrati al mantenimento dell'attività del ciclo dell'acido citrico (glicolisi aerobica), un insieme di enzimi, massimo produttore dell'energia che ci

**BUZZI, NOTARO &  
ANTONIELLI D'OULX  
s.r.l.**

consente di vivere, che è ossigeno dipendente. Dalla glicolisi anaerobica deriva il piruvato, e da questo, per carbossilazione, l'ossalacetato, o, per decarbossilazione, acetilCoA, che, condensandosi fra di loro, originano il citrato necessario al mantenimento dell'attività del ciclo. L'acetilCoA può derivare anche dalla  $\beta$ -ossidazione, o dal metabolismo di alcuni aminoacidi che pertanto vengono chiamati chetogenetici, mentre il piruvato, il citrato e l'ossalacetato possono anche essere derivati dal metabolismo di altri aminoacidi, detti glucogenetici perché da queste molecole il fegato può sintetizzare glucosio. L'utilizzazione di substrati derivati da aminoacidi o FFA permette di risparmiare il consumo di glucosio. La glicemia, al di fuori del periodo in cui l'assorbimento di cibi consenta un aumento del glucosio di origine esogena nel sangue, è mantenuta dal fegato, con la liberazione di glucosio dal deposito di riserva, il glicogeno, e con la continua neo-sintesi di glucosio a partire dagli specifici aminoacidi, la neoglucogenesi. La glicogenolisi e la neoglucogenesi sono sempre contemporaneamente attive nel periodo post-absorptivo, pur in rapporto diverso (così come la glicogenogenesi, in parte alimentata dalla neoglucogenesi). Le cellule, i tessuti e gli organi, il corpo stesso, sono dei sistemi aperti, in cui è necessario, ed è perciò possibile identificare, un input di informazioni, materiale ed energia.

Sulla base di questi presupposti biochimici generali, l'inventore ha ipotizzato che la disponibilità di specifici aminoacidi sia in grado di trasmettere alle cellule un duplice messaggio: da un lato la disponibilità di materiale plastico, dall'altro di materiale energetico. L'inventore ha inoltre ipotizzato che una specifica dimensione di disponibilità, se adeguatamente accoppiata alla durata e costanza delle variazioni di concentrazione, sia mediatore alle cellule



BUZZI, NOTARO &  
ANTONIELLI D'OULX  
s.r.l.



dell'informazione che esiste adeguata disponibilità di materiale ed energia per attivare il rinnovamento o lo sviluppo delle strutture intracellulari. Quindi, per le cellule in cui questo sia possibile, utile o necessario, attivare la duplicazione cellulare stessa.

Non esistono ipotesi simili sulle proprietà di controllo della risposta cellulare che un adeguato input sia potenzialmente in grado di dare.

Le conseguenze di questo approccio sono interessanti: esiste la possibilità di identificare un minimo comun denominatore energetico-metabolico in grado di massimizzare la risposta delle cellule, identificando qualità e quantità di una miscela di aminoacidi capaci di fornire il giusto messaggio a determinati tessuti, organi o al corpo intero. I livelli di risposta saranno presumibilmente diversi all'interno delle cellule, quindi dei tessuti, degli organi, e del corpo in toto. Corollario a questa ipotesi è quale possano essere, all'interno delle cellule, le strutture capaci di recepire i messaggi dall'ambiente, e di trasmettere alla cellula, e dalla cellula al tessuto, e così via risalendo a sempre maggiori complessità, il messaggio che sia possibile impostare nuove sintesi, o impegnare sufficienti, ma ingenti, risorse energetiche e plastiche in nuove cellule.

L'attenzione dell'inventore si è quindi accentrata sull'organello chiave nella produzione di energia, il mitocondrio. Una serie di studi recenti ha dimostrato che la sopravvivenza della cellula, la durata stessa della vita delle cellule, dipende dal mitocondrio. La presenza di ossidanti (ROS) prodotti dal metabolismo accorcia la vita al mitocondrio e alle cellule. Un recente studio ha inoltre dimostrato che, nella miocardiopatia dilatativa, i mitocondri più prossimi all'esterno delle cellule sono meno sensibili agli insulti ossidativi verso la superficie (e che quindi le sintesi procedono in modo eccentrico), sotto il

BUZZI, NOTARO &  
ANTONELLI DOULX  
s.r.l.

sarcolemma, che verso il centro delle cellule, dove i mitocondri vanno più facilmente incontro ad apoptosi (Fannin S.W. et al., Arch. Biochem. Biophys., 1999: 372, 399-407). La stessa apoptosi, tramite la cascata delle caspasi, è innescabile dai mitocondri (Dirks A. and Leeuwenburg C., Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol., 2002: 282, R519-527).

Come detto, i tre quarti delle necessità di azoto dell'organismo sono coperte da cinque aminoacidi essenziali. Quattro di questi sono aminoacidi neutri, di cui tre sono aminoacidi ramificati: leucina (cheto-genetico), isoleucina (cheto e gluco-genetico), valina (glucogenico), e la treonina (glucogenico), caratterizzata da un gruppo idrossilico in posizione  $\beta$ ; il quinto è un aminoacido basico, la lisina, che presenta un gruppo aminico ( $\text{NH}_3^+$ ) in posizione  $\epsilon$ .

Partendo dai suesposti presupposti, gli studi alla base dell'invenzione hanno permesso di identificare una miscela stechiometrica di aminoacidi che permettesse la massima utilizzazione a scopo sintetico, ottimizzando, nel contempo, la copertura delle necessità energetiche del metabolismo energetico mitocondriale. In accordo all'invenzione:

1) la miscela prevede l'impiego dell'aminoacido ramificato leucina in abbinamento ad almeno uno tra, e preferibilmente entrambi, gli aminoacidi ramificati isoleucina e valina. I rapporti, espressi in grammo-moli fra gli aminoacidi, in rapporto ad 1 grammo mole di L-Leucina, sono così identificabili:

L-Isoleucina: da 0,2 a 0,7, preferibilmente da 0,4 a 0,6;

L-Valina: da 0,2 a 0,7, preferibilmente da 0,4 a 0,6.

2) La miscela prevede, quali ulteriori ingredienti attivi, almeno uno tra, e possibilmente entrambi, gli aminoacidi treonina e lisina. I rapporti, espressi in grammo-moli fra gli aminoacidi, in rapporto ad 1 grammo mole di L-Leucina,

BUZZI, NOTARO &  
ANTONIELLI D'OULX  
s.r.l.

sono così identificabili:

L-Treonina: da 0,15 a 0,50, preferibilmente da 0,2 a 0,45;

L-Lisina: da 0,15 a 0,60, preferibilmente da 0,3 a 0,55.

Allo stato attuale degli studi effettuati dall'inventore, appare come maggiormente attiva una formulazione in cui, fatta 1 la somma di leucina, isoleucina e valina, nelle dimensioni reciproche basate sul peso molecolare identificate al punto 1), la somma di treonina e lisina siano tra il 10 ed il 50% di detta formulazione (sempre su base del peso molecolare delle sostanze in questione), preferibilmente tra il 25 ed il 45%.

3) L'apporto nutrizionale della miscela può essere completato con uno o più ulteriori aminoacidi essenziali, ed in particolare istidina, metionina, fenilalanina, triptofano. Fatta 1 la somma di leucina, isoleucina, valina, treonina e lisina, gli altri aminoacidi essenziali (istidina, metionina, fenilalanina, triptofano) sono rappresentati in quantità complessiva (sempre espressa come rapporti peso molecolare/peso molecolare) dal 2 al 25%, preferibilmente dal 5 al 15%.

4) Due aminoacidi non essenziali possono eventualmente ottimizzare la miscela dei suddetti aminoacidi, in aggiunta ad essi:

4.1) la tirosina (che è fisiologicamente prodotta per idrossilazione della fenilalanina), perché la derivazione della tirosina da fenilalanina può avvenire solo nel fegato, mentre una utilizzazione importante avviene in periferia, nel muscolo o nel miocardio, ad esempio, dove non esiste la via enzimatica di idrossilazione di detto aminoacido; la quantità di tirosina ottimale è stata identificata in una quantità dal 15 al 50% della quantità di fenilalanina presente nella miscela madre, preferibilmente dal 20 al 35%. Tanto maggiore è la

BUZZI, NOTARO &  
ANTONELLI D'OUX  
s.r.l.

compromissione epatica, o il fabbisogno periferico in funzione di un apporto da altre fonti ridotto, tanto maggiore sarà l'utilità di aumentare i rapporti stechiometrici fra tirosina e fenilalanina, fino ad un massimo indicativo del 50%;

4.2) la cist(e)ina, che sarà preferibilmente almeno il 100%, con un quantitativo ottimale identificato essere compreso fra il 150 ed il 350%, della quantità di metionina presente nella miscela madre.

La suddetta presenza di cisteina, facilmente trasformabile metabolicamente in metionina, eviterà che carenze relative di cisteina, nel processo di interconversione della metionina in cisteina, diano origine, e si fermino, in condizioni di eccesso relativo di metionina, o di carenze di folati, all'intermedio tossico, l'omocisteina.

5) Uno o più altri aminoacidi possono essere previsti quali ulteriori ingredienti attivi della miscela, la somma in peso molecolare dei quali sarà in una percentuale inferiore del 20% rispetto agli altri ingredienti attivi, e meno del 10% per ogni singolo ulteriore aminoacido.

6) Nella sua formulazione preferita, la miscela secondo l'invenzione ha un pH in una soluzione di acqua compreso tra 6,5 e 8,5, con o senza eccipienti adatti per la preparazione di tavolette, capsule, polveri, eccetera in ogni presentazione farmacologica adatta per uso enterale o parenterale.

Ulteriori specificazioni, in termini di quantità e rapporti tra i vari aminoacidi previsti dalle composizioni secondo l'invenzione, sono contenute nelle allegate rivendicazioni, che costituiscono parte integrante della presente descrizione. Sebbene espressi su base di peso molecolare, i rapporti indicati nelle allegate rivendicazioni sono applicabili, in termini generali, anche nel caso di calcolo sulla base del peso in grammi dei vari aminoacidi indicati (tenendo



BUZZI, NOTARO &  
ANTONIELLI DOULX  
s.r.l.

tuttavia presente che la quantità di lisina, espressa in grammi, potrà allora essere maggiore rispetto alle singole quantità di isoleucina e valina).

Un esempio di formulazione della miscela di aminoacidi secondo l'invenzione, realizzata in accordo ai principi indicati, è riportata nella seguente tabella:

**TABELLA 1**

Aminoacido	Peso Molec.*	g/100g	% su totale	% su cluster
L- Leucina	131,17	31,2500	31,25%	50,00%
L-Isoleucina	131,17	15,6250	15,63%	25,00%
L-Valina	117,15	15,6250	15,63%	25,00%
<b>Totali Cluster A</b>		<b>62,5000</b>	<b>62,50%</b>	<b>100,00%</b>
L-Lisina	146,19	16,2500	16,25%	65,00%
L-Treonina	119,12	8,7500	8,75%	35,00%
<b>Totali Cluster B</b>		<b>25,0000</b>	<b>25,00%</b>	<b>100,00%</b>
L-Istidina	155,16	3,7500	3,75%	46,88%
L-Fenilalanina	165,19	2,5000	2,50%	31,25%
L-Metionina	149,21	1,2500	1,25%	15,63%
L-Triptofano	204,23	0,5000	0,50%	6,25%
<b>Totali Cluster C</b>		<b>8,0000</b>	<b>8,00%</b>	<b>100,00%</b>
L-Tirosina	181,19	0,7500	0,75%	
L-Cistina	240,30	3,7500	3,75%	

**Totali composizione: 100,0000 100,00%**

\* da "Amino Acid, Nucleic Acids & Related Compounds - Specification/General Tests", 8<sup>th</sup> Edition, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

Nella tabella che segue, le quantità in grammi della composizione di cui alla Tabella 1 sono espresse su base di peso molecolare.

**BUZZI, NOTARO &  
ANTONELLI D'OUXX  
s.r.l.**

**TABELLA 2**

<b>Aminoacido</b>	<b>Peso Molec.</b>	<b>moli</b>	<b>% su totale</b>	<b>% su cluster</b>
L- Leucina	131,17	0,23824	31,97%	48,55%
L-Isoleucina	131,17	0,11912	15,98%	24,27%
L-Valina	117,15	0,13338	17,90%	27,18%
<b>Totali Cluster A</b>		<b>0,49074</b>	<b>65,85%</b>	<b>100,00%</b>
L-Lisina	146,19	0,11116	14,92%	60,21%
L-Treonina	119,12	0,07346	9,86%	39,79%
<b>Totali Cluster B</b>		<b>0,18461</b>	<b>24,77%</b>	<b>100,00%</b>
L-Istidina	155,16	0,02417	3,24%	48,21%
L-Fenilalanina	165,19	0,01513	2,03%	30,19%
L-Metionina	149,21	0,00838	1,12%	16,71%
L-Triptofano	204,23	0,00245	0,33%	4,88%
<b>Totali Cluster C</b>		<b>0,05013</b>	<b>6,73%</b>	<b>100,00%</b>
L-Tirosina	181,19	0,00414	0,56%	
L-Cistina	240,30	0,01561	2,09%	
<b>Totali composizione</b>		<b>0,74522</b>	<b>100,00%</b>	

**BUZZI, NOTARO &  
ANTONIELLI D'OUX  
s.r.l.**

Come risulterà chiaro in seguito, la somministrazione di una miscela secondo l'invenzione, e segnatamente secondo la Tabella 1, risulta decisiva nell'aumentare il numero di mitocondri, e ciò porta ad una inibizione dell'apoptosi, da un lato, con un meccanismo preciso, caspasi mediato, che è l'inibizione della attivazione della caspasi specificamente attivata dalla sofferenza mitocondriale. Dall'altro lato, questo porta ad un aumento della disponibilità di energia di ogni singola cellula, e quindi al miglioramento clinico di cui si parla.

La miscela è funzionale al raggiungimento di questo risultato in virtù di

peculiari rapporti stechiometrici fra "clusters" di aminoacidi, rilevabili anche dalla Tabella 2. Si noti che questi non sono necessariamente "clusters" chimico fisici, né hanno altre caratteristiche metaboliche comuni se non il risultato finale cui mirano i peculiari rapporti stechiometrici: coprire i fabbisogni energetici, e lasciare comunque disponibilità di substrato aminoacidico per le sintesi necessarie. E' la contemporanea disponibilità a coprire entrambe le necessità che attua il comando antiapoptotico e sintetico.

### Studi clinici

Il problema è stato affrontato in due modi diversi, clinico e sperimentale, procedendo in sequenza logica.

Sapendo che negli anziani si produce una riduzione del numero di mitocondri nella struttura o massa muscolare, è stato eseguito uno studio clinico per verificare se gli effetti della supplementazione con la miscela di cui alla Tabella 1 fossero confermabili in anziani con problemi di limitazione alla mobilità. In pazienti di questo tipo, una ridotta mobilità crea disabilità al movimento, causando perdita del trofismo muscolare, e questa, in un circolo vizioso, ridotta mobilità. In questi pazienti l'incapacità di adeguare la funzione cardiaca al maggiore carico di lavoro richiesto dalla attività fisica può diventare uno dei fattori limitanti.

Sono stati pertanto arruolati 40 pazienti di età superiore a 65 anni, con una vita sedentaria ed una bassa qualità di vita in relazione allo stato di salute, con una eiezione ventricolare (VE) normale a riposo, senza angina, o altre patologie invalidanti. La ridotta attività fisica veniva documentata da un test di camminata di 6 minuti, e la percezione di una difficoltosa deambulazione tramite un questionario sulla invalidità al camminare. Inoltre, con un dinamometro, è

BUZZI, NOTARO &  
ANTONELLI D'OUX  
s.r.l.



stata misurata la forza muscolare isometrica massimale. Inoltre, la VE è stata misurata a riposo e durante esercizio isometrico con ecocardiografia bidimensionale. I dati sono stati valutati prima e dopo 3 mesi di introduzione orale della miscela di aminoacidi di cui alla Tabella 1.

Il BMI (Body Mass Index) non è stato modificato dalla terapia, ma la distanza percorsa camminando in 6 minuti è aumentata da metri  $214,5 \pm 32$  a metri  $262,8 \pm 34,8$  ( $P < 0,001$ ) dopo il trattamento, così come i dati del questionario di autovalutazione, per distanza, velocità e numero di piani di scale ( $P < 0,001$  rispetto ai valori basali). La VE a riposo (normale:  $> 50\%$ ) non è stata modificata dalla terapia, così come pressione e frequenza.

La capacità di esercizio isometrico misurata con dinamometro (handgrip test), invece, aumentò da  $16,6 \pm 2,4$  a  $19,2 \pm 2,2$  ( $P < 0,001$ ). Sotto sforzo, la VE deve non variare o aumentare, in condizioni normali, di  $> 0,05$  U. All'ingresso, il 66% dei pazienti aveva un declino della VE sotto sforzo ( $P > 0,005$ ), mentre il rimanente 34% aveva una risposta normale. Nel 93% ( $P < 0,001$ ) dei pazienti con un VE alterato, dopo tre mesi di terapia, il VE sotto sforzo risultò aumentato o non cambiato rispetto al basale, cioè normalizzato.

Differenti modelli sperimentali sono stati attuati per interpretare e comprendere il meccanismo attraverso cui la suddetta miscela di aminoacidi potesse attivare una migliore performance energetica delle cellule muscolari del miocardio nello studio clinico descritto.

Un primo modello sperimentale, usando il cuore isolato perfuso di ratto, ha fornito indicazioni indirette, che hanno permesso di confermare come fosse il mitocondrio l'organello da studiare come possibile attore dei risultati ottenuti. A tale scopo, in un cuore di ratto isolato, perfuso con soluzione tampone standard,

BUZZI, NOTARO &  
ANTONIELLI D'OULX  
s.r.l.



ad una fase di perfusione di 30 minuti, veniva fatta seguire una fase di ischemia completa (legatura delle coronarie) e asistolia protratta per 30 minuti; quindi, il miocardio veniva riperfuso e fatto ripartire a battere.

I gruppi erano tre:

a) i controlli,

b) un gruppo simile ai controlli, ma con una perfusione acuta della miscela di cui alla Tabella 1, in quantità pari a 0,25 mg/mL nella fase di 30 minuti che precedeva l'ischemia ed in quella di riperfusione post-ischemica,

c) un gruppo di animali trattati per 20 giorni con 1g/Kg/d della miscela di cui alla Tabella 1, prima dell'attuarsi dell'isolamento del miocardio.

Le variabili misurate sono state:

- la pressione arteriosa (PA) sistolica e diastolica;
- il release di creatinfosfochinasi (CPK) e di lattato (test enzimatici);
- l'attività mitocondriale (con elettrodo di Clark);
- l'apoptosi delle cellule endoteliali e dei cardiomiociti (con TUNEL);
- l'attività delle caspasi 3 e 9 nell'endotelio e nei cardiomiociti (con test fluorimetrico).

I risultati si possono così riassumere.

Il gruppo "a" (controlli) e il gruppo "b" (perfusione acuta in animale non trattato) hanno mostrato risultati sovrapponibili per tutti i parametri citati, e quindi nessun effetto. Al contrario, i cuori di animali del gruppo "c" (pre-trattati per 20 giorni con 1g/Kg/d della miscela di cui alla Tabella 1 prima dell'attuarsi dell'isolamento del miocardio) hanno dimostrato avere una pressione arteriosa (PA) diastolica nettamente più bassa, nonché una risposta funzionale alla riperfusione ed alla ripresa della contrazione ventricolare nettamente superiore.

BUZZI, NOTARO &  
ANTONIELLI D'OUXX  
s.r.l.

Così pure erano significativamente ridotte il release di CPK (indicando così una maggiore integrità delle membrane cellulari) ed il release di lattato, il che indica una maggiore utilizzazione del piruvato da parte del ciclo dell'acido citrico, pur in totale assenza di ossigeno, non essendo più in arrivo con il sangue.

A questo punto si è verificato se vi fosse un aumento della produzione energetica, e come questa potesse influenzare la contrattilità miocardica durante una fase ischemica protratta, e nella fase di riperfusione.

Usando la stessa metodologia, e gli stessi gruppi di trattamento, è stato quindi studiato il contenuto tissutale di ATP e Creatina fosfato (CF), così come l'attività mitocondriale, valutando la  $VO_2$  e la produzione di ATP mitocondriale.

Solo il trattamento cronico (gruppo "c": 1g/Kg/d della miscela di cui alla Tabella 1 prima dell'attuarsi dell'isolamento del miocardio) ha dato luogo a modificazioni statisticamente significative dei parametri esaminati, inducendo un miglioramento, in incremento, della attività dei mitocondri.

Poiché l'integrità dei mitocondri è fondamentale per il mantenimento della integrità delle cellule viventi, particolarmente interessante è stato identificare se la miscela di cui alla Tabella 1 avesse un effetto sulla apoptosi, e, per comprendere i possibili meccanismi di controllo, si sono studiati diversi livelli della cascata delle caspasi, meccanismi enzimatici che controllano l'apoptosi intracellulare.

Il mitocondrio, essendo l'organello che produce energia, è fondamentale per la vita della cellula. La perdita di mitocondri si tradurrà in una progressiva perdita di patrimonio energetico nella cellula, con compromissione progressiva dei processi di eliminazione del materiale di scoria, delle sintesi e della funzione cellulare. La cellula diventa sempre meno capace di auto-mantenersi: quindi, il

BUZZI, NOTARO &  
ANTONIELLI D'OULX  
s.r.l.

processo apoptotico (una forma di suicidio cellulare) si attua per ridurre il numero di cellule inefficienti, e dare alle altre possibilità di sostituirle o di sopravvivere in condizioni di minore competizione sui substrati. La apoptosi è controllata da diversi meccanismi, alcuni extracellulari, per attivazione di recettori specifici, alcuni intracellulari, di cui il principale, forse indispensabile mediatore post-recettoriale anche per gli altri, è di controllo mitocondriale. L'apoptosi dei mitocondri libera in citoplasma il citocromo C, e questo attiva la caspasi 9, cui consegue diretta attivazione della restante cascata apoptotica.

Questa notazione è di particolare importanza nel comprendere il meccanismo di azione sulla apoptosi di diversi approcci terapeutici: è specifico il controllo del mitocondrio sulla caspasi 9 e, quindi, per essere certi di non aver creato eventi casuali o possibili interferenze con altri meccanismi di attivazione di caspasi diverse, è stata studiata anche la caspasi 8 (la cui attivazione è principalmente legata alla IL-1 ed al  $\text{TNF}\alpha$ ).

La presenza di caspasi 9 (dosata da un laboratorio esterno in cieco), è l'unica risultata significativamente depressa, negli animali del gruppo "c", trattati cronicamente per os per 20 giorni, con 1g/Kg/d della miscela di cui alla Tabella 1 prima dell'attuarsi dell'isolamento del miocardio. Nessuna modificazione si è osservata nello studio della caspasi 8, attivata da recettori di membrana.

Questa serie di studi permette di comprendere come i risultati osservati in sperimentale, e nello studio clinico in umano di cui si è detto all'inizio, sia necessariamente da ascrivere al mitocondrio, indipendentemente da attivazione recettoriale ed influenze extracellulari.

Infine, dunque, si è verificato se la maggiore efficienza metabolica cellulare fosse dovuta ad una aumentata attività di singoli mitocondri o - evento

BUZZI, NOTARO &  
ANTONELLI D'OUX  
s.r.l.



noto come indispensabile durante la duplicazione cellulare, storicamente ben documentato e filmato in osservazioni sperimentali (Padoa E. 1967, in: Biologia Generale, III edizione. Capitolo 4: La cellula, 116-189, Boringhieri Editore SpA, Torino), ma mai neanche ipotizzato essere inducibile in condizioni fisiologiche o patologiche - se i mitocondri si moltiplicassero, incrementando il loro numero, come risposta alla introduzione della miscela di aminoacidi secondo l'invenzione.

Si è dunque addivenuti alla necessità di contare il numero di mitocondri, prima e dopo il trattamento, in condizioni patologiche che ne riducessero il numero, e simili a quelle in cui lo studio in umano era stato condotto.

Sono stati presi ratti Wistar di 18 mesi, controllati a 22 e 24 mesi. Un gruppo di controllo era paragonato ad un gruppo che veniva trattato con la miscela di aminoacidi secondo l'invenzione, secondo un criterio di randomizzazione. Per prima cosa il numero di mitocondri (MT) è stato contato in modo indipendente, utilizzando metodi istochimici e ultrastrutturali (per microscopia elettronica) in animali di 6 mesi, come controllo. Il numero dei mitocondri nel muscolo periferico, nel miocardio e nelle cellule della corteccia cerebrale, era ridotto dall'età (minore negli animali più anziani).

La somministrazione della miscela di cui alla Tabella 1 di  $0,3\text{g/Kg/d}^{-1}$  agli animali senescenti è risultato essere estremamente efficiente nel mantenere più integro il patrimonio di mitocondri, per un valore percentuale del  $26\pm 5\%$  e  $31\pm 7\%$  rispettivamente più elevato rispetto agli animali comparabili per età, non trattati sia a 22 che a 24 mesi.

Con ciò si dimostra che aumentare il numero di mitocondri non solo è possibile, ma certamente terapeutico in diverse condizioni.

BUZZI, NOTARO &  
ANTONELLI D'OUX  
s.r.l.

Successive analisi hanno consentito di appurare che un miglioramento del  $23 \pm 4\%$  del numero dei mitocondri era possibile con soli cinque aminoacidi della miscela di Tabella 1, usando un rapporto stechiometrico di circa 1 : 0,5 fra la somma di leucina, isoleucina e valina (1), e la somma di treonina e lisina (0,5). Togliendo treonina e/o lisina, il numero di mitocondri non si modificava in tutti gli animali in modo significativo. La riduzione della leucina al di sotto del 15% del peso totale della miscela portava a vanificare in modo significativo gli effetti positivi della miscela, mentre, minori erano gli effetti, pur statisticamente significativi, se la sola isoleucina, o la sola valina venivano ridotte nella stessa proporzione dalla miscela, se la leucina era mantenuta costante (in tale ottica, le composizioni secondo l'invenzione potranno prevedere sino al 60% di leucina ma non meno del 15% rispetto agli altri due aminoacidi ramificati, fino al 40% di isoleucina, ma non meno del 15% rispetto agli altri due aminoacidi ramificati e fino al 40% di valina, ma non meno del 15% rispetto agli altri due aminoacidi ramificati).

Gli studi preliminari effettuati, in cui differenti tipi di condizioni relative all'input nutrizionale, ed alla entità dell'esercizio fisico imposto, hanno consentito di confermare, in volontari, che i rapporti stechiometrici rivendicati fra i diversi aminoacidi tengono conto delle esigenze più estreme, minimizzando la possibilità che un singolo aminoacido si trovi in eccesso, o in carenza, nel rapporto reciproco con gli altri e che tali rapporti permettono la massima utilizzazione degli aminoacidi a scopo sintetico, ottimizzando, nel contempo, la copertura delle necessità energetiche del metabolismo energetico mitocondriale.

Da quanto sopra risulta chiaro come le composizioni secondo l'invenzione si dimostrino utili per il trattamento di condizioni patologiche

BUZZI, NOTARO &  
ANTONELLI D'OUX  
s.r.l.

contraddistinte da insufficiente funzione mitocondriale negli umani e negli animali, quali la sarcopenia dell'anziano e la senescenza, in quanto atte a mantenere integri e/o ripristinare e/o aumentare il numero di mitocondri intracellulari, nonché a modificare in senso positivo l'attività di produzione di energia intracellulare. Le composizioni secondo l'invenzione risultano così utili in ogni condizione in cui un aumento di una ridotta attività energetica cellulare possa modificare in modo vantaggioso l'attività della cellula stessa, e quindi del tessuto ed organo che l'insieme di cellule compone, quale un aumento dell'attività neuronale nelle malattie degenerative del sistema nervoso (Alzheimer, sclerosi laterale amiotrofica, Parkinson), in cui l'attività delle cellule decresce per ridotta capacità energetica, che coinvolge una perdita dell'attività energetica mitocondriale. Parimenti, le composizioni secondo l'invenzione sono idonee all'uso in ogni condizione in cui stati ischemici di qualunque eziologia inibiscano la attività energetica della cellula, promuovendo il mantenimento delle strutture atte a produrre energia, ed in particolare l'integrità dei mitocondri. Le composizioni si dimostrano anche utili per l'impiego in ogni condizione in cui sia utile alla funzione dell'organo l'antagonizzare i fenomeni apoptotici dei mitocondri e controllati dai mitocondri, non legati ad apoptosi mediata da recettori di membrana cellulari e tramite altre caspasi che non siano quelle attivate dalla caspasi 9.

L'ambito di applicazione dell'invenzione si estende a derivati attivi di aminoacidi, nonché a proteine ottenute tramite ingegneria genetica o qualsiasi altro metodo artificiale, che abbiano una composizione stechiometrica di aminoacidi come sopra descritta ed in seguito rivendicata.

\* \* \* \* \*

\* \* \*

### RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la preparazione di una composizione o una proteina idonea a mantenere integro e/o ripristinare e/o aumentare il numero di mitocondri cellulari, ovvero a modificare in senso positivo l'attività di produzione di energia intracellulare, caratterizzata dal fatto di prevedere l'impiego, quali ingredienti attivi, dell'aminoacido ramificato leucina in abbinamento ad almeno uno tra gli aminoacidi ramificati isoleucina e valina.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui sia leucina che isoleucina e valina sono utilizzati come ingredienti attivi.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il rapporto tra la quantità di isoleucina e la quantità di leucina, su base di peso molecolare, è da 0,2 a 0,7, preferibilmente da 0,4 a 0,6.

4. Procedimento secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il rapporto tra la quantità di valina e la quantità di leucina, su base di peso molecolare, è da 0,2 a 0,7, preferibilmente da 0,4 a 0,6.

5. Procedimento secondo almeno una delle rivendicazioni precedenti, in cui almeno una tra treonina e lisina è previsto come ulteriore ingrediente attivo.

6. Procedimento secondo la rivendicazione 5, in cui il rapporto tra la quantità di treonina e la quantità di leucina, su base di peso molecolare, è da 0,15 a 0,50, preferibilmente da 0,2 a 0,45.

7. Procedimento secondo la rivendicazione 5, in cui il rapporto tra la quantità di lisina e la quantità di leucina, su base di peso molecolare, è da 0,15 a 0,60, preferibilmente da 0,3 a 0,55.

8. Procedimento secondo la rivendicazione 5, in cui treonina e lisina sono

BUZZI, NOTARO &  
ANTONIELLI D'OULX  
s.r.l.

entrambi presenti quali ulteriori ingredienti attivi e la somma delle loro quantità è tra 10 ed il 50% %, preferibilmente tra il 25 ed il 45%, della somma delle quantità di leucina, isoleucina e valina, su base di peso molecolare.

9. Procedimento secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, in cui sono previsti, quali ulteriori ingredienti attivi, uno o più aminoacidi essenziali selezionati nel gruppo consistente di istidina, metionina, fenilalanina, triptofano.

10. Procedimento secondo la rivendicazione 9, in cui sono previsti quali ulteriori ingredienti attivi istidina, metionina, fenilalanina, triptofano.

11. Procedimento secondo la rivendicazione 10, in cui la somma della quantità di istidina, metionina, fenilalanina, triptofano è dal 2 al 25%, preferibilmente dal 5 al 15%, della somma delle quantità di leucina, isoleucina, valina, treonina e lisina, su base di peso molecolare.

12. Procedimento secondo la rivendicazione 9, in cui almeno una tra tirosina e cist(e)ina è prevista quale ulteriore ingrediente attivo.

13. Procedimento secondo le rivendicazioni 9 e 12, in cui tirosina è in quantità dal 15 al 50%, preferibilmente dal 20 al 35%, della quantità di fenilalanina, su base di peso molecolare.

14. Procedimento, secondo le rivendicazioni 9 e 12, in cui la quantità di cist(e)ina è almeno il 100%, e preferibilmente compresa fra il 150 ed il 350%, della quantità di metionina, su base di peso molecolare.

15. Procedimento secondo la rivendicazione 12, in cui uno o più ulteriori aminoacidi sono previsti quali ingredienti attivi, la somma in peso molecolare dei quali è in una percentuale inferiore del 20% rispetto agli altri ingredienti attivi e/o meno del 10% per ogni singolo ulteriore aminoacido.

16. Procedimento secondo almeno una delle rivendicazioni precedenti, in



**BUZZI, NOTARO &  
ANTONELLI DOULX  
s.r.l.**



cui la somma delle singole quantità di treonina e lisina, su base di peso molecolare, è minore rispetto alla somma delle singole quantità dei suddetti aminoacidi ramificati, ma maggiore rispetto alla somma delle singole quantità degli altri aminoacidi essenziali previsti nella composizione.

17. Procedimento secondo almeno una delle rivendicazioni precedenti, in cui la quantità di treonina, su base di peso molecolare, è minore rispetto alle singole quantità di lisina e dei suddetti aminoacidi ramificati, ma maggiore rispetto alle singole quantità degli altri aminoacidi essenziali previsti nella composizione.

18. Procedimento secondo almeno una delle rivendicazioni precedenti, in cui la quantità di lisina, su base di peso molecolare, è minore rispetto singole quantità dei suddetti aminoacidi ramificati, ma maggiore rispetto alle singole quantità degli altri aminoacidi essenziali previsti nella composizione.

19. Procedimento secondo almeno una delle rivendicazioni precedenti, in cui la quantità di treonina, su base di peso molecolare, è minore rispetto alle singole quantità di lisina e dei suddetti aminoacidi ramificati, ma maggiore rispetto alla somma delle singole quantità degli altri aminoacidi essenziali previsti nella composizione.

20. Procedimento secondo almeno una delle rivendicazioni precedenti, in cui la quantità di lisina, su base di peso molecolare, è minore rispetto singole quantità dei suddetti aminoacidi ramificati, ma maggiore rispetto alla somma delle singole quantità degli altri aminoacidi essenziali previsti nella composizione.

21. Procedimento secondo almeno una delle rivendicazioni precedenti, in cui la composizione ha un pH in una soluzione di acqua compreso tra 6,5 e 8,5,

**BUZZI, NOTARO &  
ANTONELLI D'OULX  
s.r.l.**

con o senza eccipienti adatti per la preparazione di tavolette, capsule, polveri, eccetera, in ogni presentazione farmacologica adatta per uso enterale o parenterale.

22. Uso di una composizione o una proteina ottenuta con il procedimento secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 21 per la produzione di una formulazione per il trattamento di condizioni patologiche contraddistinte da insufficiente o ridotta funzione mitocondriale, quali

- malattie degenerative del sistema nervoso, ed in particolare Alzheimer, sclerosi laterale amiotrofica, Parkinson;
- apoptosi di origine mitocondriale;
- stati ischemici che inibiscono l'attività energetica della cellula;
- sarcopenia dell'anziano,
- senescenza.

23. Uso di una composizione o proteina ottenuta con il procedimento secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 21 per la produzione di una formulazione idonea ad aumentare l'attività neuronale in malattie degenerative del sistema nervoso.

24. Uso di una composizione o proteina ottenuta con il procedimento secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 21 per la produzione di una formulazione idonea al mantenimento delle strutture atte a produrre energia cellulare, ed in particolare al mantenimento dell'integrità dei mitocondri.

25. Uso di una composizione o proteina ottenuta con il procedimento secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 21 per la produzione di una formulazione idonea all'impiego in ogni condizione in cui una migliorata utilizzazione periferica di ossigeno è vantaggiosa nei pazienti con progressiva

BUZZI, NOTARO &  
ANTONELLI D'OUX  
s.r.l.

perdita di cellule conseguente ad apoptosi mediata dai mitocondri, in particolare tramite attivazione della caspasi 9.

26. Uso di una composizione o proteina ottenuta con il procedimento secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 21 per la produzione di una formulazione idonea ad antagonizzare i fenomeni apoptotici dei mitocondri e controllati dai mitocondri, attivati dalla caspasi 9.

27. Uso di una composizione o proteina ottenuta con il procedimento secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 21 per la produzione di una formulazione idonea ad aumentare l'attività energetica cellulare, e quindi del tessuto ed organo che l'insieme di cellule compone, quale un aumento dell'attività neuronale nelle malattie degenerative del sistema nervoso, in cui l'attività delle cellule decresce per ridotta capacità energetica che coinvolge una perdita dell'attività energetica mitocondriale.

28. Una proteina ottenuta tramite ingegneria genetica o altro metodo artificiale, avente una composizione di aminoacidi come ad una o più delle rivendicazioni da 1 a 21.

29. Composizioni a base di aminoacidi, secondo una o più delle rivendicazioni precedenti.

Il tutto sostanzialmente come descritto ed illustrato, e per gli scopi specificati.

Ing. Franco BUZZI  
N. Iscriz. ALBO 259  
(in proprio o per gli altri)

  
CAMERA DI COMMERCIO  
INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA  
DI TORINO